

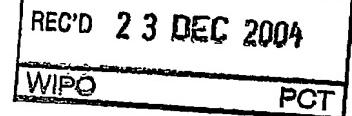
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

05.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年11月 7日



出願番号
Application Number: 特願 2003-379167
[ST. 10/C]: [JP 2003-379167]

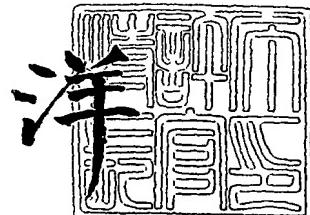
出願人
Applicant(s): 花王株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月13日

特許長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P05021511
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
 C12N 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内
【氏名】 東畠 正敏

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内
【氏名】 澤田 和久

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内
【氏名】 小野口 敬子

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内
【氏名】 小澤 忠弘

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内
【氏名】 尾崎 克也

【発明者】
【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8916-5 奈良先端科学技術大学院大学
 情報科学研究科内
【氏名】 小林 和夫

【発明者】
【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8916-5 奈良先端科学技術大学院大学
 情報科学研究科内
【氏名】 小笠原 直毅

【特許出願人】
【識別番号】 000000918
【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】
【識別番号】 110000084
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100068700
【弁理士】
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】
【識別番号】 100077562
【弁理士】
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】
【識別番号】 100096736
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【その他】

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成14年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構、生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項1】**

枯草菌の遺伝子comA、yopO、treR、yvbA、cspB、yvaN、yttP、yurK、yozA、licR、sigL、mntR、glcT、yvdE、ykvE、sLR、rocR、ccpA、yaaT、yvaA、yyCH、yacP、hprK、rsiX、yhdK及びy1b0のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか1以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

【請求項2】

微生物が枯草菌又はその他のバチルス属細菌である請求項1記載の組換え微生物。

【請求項3】

異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の上流に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌用シグナル領域を結合した請求項1又は2記載の組換え微生物。

【請求項4】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、バチルス属細菌のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子の上流0.6～1kb領域に由来するものである請求項3記載の組換え微生物。

【請求項5】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、配列番号1で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号1～659の塩基配列、配列番号3で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号1～696の塩基配列又は当該塩基配列のいずれかと70%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA断片、又は当該塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなるDNA断片である請求項3記載の組換え微生物。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項記載の組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】組換え微生物

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に用いる組換え微生物、及びタンパク質又はポリペプチドの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬や、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

【0003】

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。特に最近では、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、遺伝子組換えの技術等を用いたより効率的な生産菌の育種が行われるようになっており、遺伝子組換えのための宿主微生物の開発が進められている。例えば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Marburg No. 168系統株の様に宿主微生物として安全かつ優良と認められた微生物菌株に更に改良を加えた菌株が開発されている。

【0004】

しかしながら、微生物は元来、自然界における環境変化に対応するための多種多様な遺伝子群を有しており、限定された生産培地が使用されるタンパク質等の工業的生産においては、必ずしも生産効率が高いとは言えない状況であった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物にタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供することを目的とする。

◦ 【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、微生物ゲノム上にコードされる各種遺伝子において、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な働きをする遺伝子群を鋭意探索したところ、枯草菌等の微生物の特定の遺伝子をゲノム上から削除又は不活性化した後、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入することにより、目的のタンパク質又はポリペプチドの生産性が、削除又は不活性化前と比較して向上することを見出した。

◦ 【0007】

すなわち本発明は、枯草菌の遺伝子 comA、yopO、treR、yvbA、cspB、yvaN、yttP、yurK、yozA、licR、sigL、mntR、glcT、yvdE、ykvE、sir、rocR、ccpA、yaAT、yyA、yyCH、ycP、hprK、rsiX、yhdK 及び y1b0 のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか 1 以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物変異株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、特に異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の上流に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域、又は分泌用シグナル領域を結合した当該組換え微生物、また当該組換え微生物を用いたタンパク質又はポリペプチドの製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明の微生物は、目的タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要、或いは有害な遺伝子が削除、又は不活性化されているため、エネルギー消費、副産物の生産や比生産速度の低下等、培地の浪費が大幅に減少でき、また、タンパク質又はポリペプチドの生産時間が長期化することによって効率よく目的生産物を生産することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明においてアミノ酸配列および塩基配列の同一性はLipman-Pearson法 (Science, 27, 1435, (1985)) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェア Genetyx -Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、U nit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。

【0010】

本発明の微生物を構築するための親微生物としては、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要な遺伝子、具体的には表1に示す枯草菌の遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子を有するものであればよく、野生型のものでも変異を施したものより、具体的には、枯草菌などのバチルス (Bacillus) 属細菌や、クロストリジウム (Clostridium) 属細菌、或いは酵母等が挙げられ、中でもバチルス (Bacillus) 属細菌が好ましい。更に、全ゲノム情報が明らかにされ、遺伝子工学、ゲノム工学技術が確立されている点、またタンパク質と菌体外に分泌生産させる能力を有する点から特に枯草菌が好ましい。

【0011】

本発明の微生物を用いて生産する目的タンパク質又はポリペプチドとしては、例えば食品用、医薬品用、化粧品用、洗浄剤用、繊維処理用、医療検査薬用等として有用な酵素や生理活性因子等のタンパク質やポリペプチドが挙げられる。

【0012】

例えば、枯草菌にはゲノム上に4106個の遺伝子が存在することが知られているが、本発明において削除、又は不活性の対象となる遺伝子群は、目的タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な働きをする遺伝子群であり、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子群の中から選択されるものである。斯かる遺伝子群は、目的タンパク質又はポリペプチドの生産には直接関与しておらず、また、通常の工業的生産培地における微生物の生育にも不要であることが本発明者らによって見出された。

【0013】

尚、表中の各遺伝子の名称、番号及び機能等は、Nature, 390, 249-256, (1997) で報告され、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for Bacillussubtilis (BSORF DB) でインターネット公開 (<http://bacillus.genome.ad.jp/>、2003年6月17日更新) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載している。

【表1】

遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子機能など
comA	BG10381	2成分制御系制御因子
yopO	BG13648	推定転写制御因子、spβプロファージタンパク質
treR	BG11011	トレハロースオペロンの転写抑制因子 (GntRファミリー)
yvba	BG14078	推定転写制御因子 (ArsRファミリー)
cspB	BG10824	低温ショック対応主要因子
yvaN	BG14069	推定転写制御因子
yttP	BG13927	推定転写制御因子 (TetRファミリー)
yurK	BG13997	推定転写制御因子 (GntRファミリー)
yoza	BG13748	推定転写制御因子 (ArsRファミリー)
licR	BG11346	転写制御因子 (アンチターミネーター)、リケナンオペロン (licB CAH) 制御
sigL	BG10748	RNAポリメラーゼ σ 因子 (σ 54型)
mntR	BG11702	マンガン輸送制御
glcT	BG12593	ptsGHIオペロン発現必須な転写制御因子 (BglGファミリー、アンチターミネーター)
yvdE	BG12414	推定転写制御因子 (LacIファミリー)
ykvE	BG13310	推定転写制御因子 (MarRファミリー)
slr	BG11858	コンピテンス及び胞子形成関連遺伝子の転写活性化因子
rocR	BG10723	アルギニン資化オペロンの転写活性化因子 (NtrCファミリー)
ccpA	BG10376	炭素源異化代謝抑制関与転写制御因子 (LacIファミリー)
yaaT	BG10096	II型シグナルペプチダーゼ類似タンパク質
yyaA	BG10057	DNA結合タンパク質Spo0J類似タンパク質
yych	BG11462	機能未知 (他生物に相同遺伝子あり)
yacP	BG10158	機能未知 (他生物に相同遺伝子あり)
hprK	BG14125	Hprタンパク質Ser残基リン酸化/脱リン酸化酵素
rxiX	BG10537	アンチ σ X 因子
yhdK	BG13017	機能未知、σ M 因子の発現抑制関連
ylbO	BG13367	σ E 関与母細胞内遺伝子の発現調節

[0 0 1 4]

【0014】
また、表1に示される枯草菌の各遺伝子と同じ機能を有する、または、表1の各遺伝子と塩基配列において70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する、他の微生物由来、好ましくはバチルス属細菌由来の遺伝子は、表1に記載の遺伝子に相当する遺伝子と同一と考えられ、本発明において削除、不活性化すべき遺伝子に含まれる。尚、塩基配列の同一性はLipman-Pearson法(Science, 227, 1435, (1985))によって計算される。

[0 0 1 5]

【0015】 表1に示される枯草菌の遺伝子群の中には、各種遺伝子発現の活性化や抑制に関わる制御遺伝子、或いは構造の類似性から制御遺伝子であろうと推定されるものが多く存在していることから、タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な遺伝子制御の存在が本発明によって明らかになった。

【0016】

特に、グルコースのPTS取り込み系オペロンのアンチターミネーターであるglcT遺伝子、リケナン分解系オペロンのアンチターミネーターであるlicT遺伝子、トレハロース取り込み、代謝系オペロンのリプレッサーであるtreR遺伝子、更には、グルコースカタボラリープレッシャーccpA遺伝子やhprK遺伝子など、糖の取り込み、代謝に関わるイトリプレッションに関わるccpA遺伝子やhprK遺伝子など、糖の取り込み、代謝に関わる

制御遺伝子が多く存在しており、注目に値する。

【0017】

その他、糖の取り込み、代謝に関わる制御遺伝子以外の制御遺伝子として、アルギニン資化の活性化に関するrocR遺伝子やコンピテンス関連の制御遺伝子comA、slr等を削除又は不活性化することによりタンパク質又はポリペプチドの生産性が向上する。

【0018】

また、表1に示される遺伝子群の中には、ECFシグマ因子のひとつであるシグマXの発現を抑制するアンチECFシグマ因子をコードするrsiX遺伝子、及び同じくシグマMの発現抑制に関する報告例があるyhdK遺伝子 (Mol Microbiol., 32, 41, (1999)) などが存在し、また逆にシグマLをコードするsigL遺伝子が含まれており、シグマXやシグマMの制御下にある遺伝子の発現がタンパク質生産にとって好ましく、逆にシグマL制御下の何らかの遺伝子発現がタンパク質生産にとって好ましくないことが示唆されている。

【0019】

斯かる遺伝子群の中から選ばれる1又は複数の遺伝子を削除又は不活性化することにより、タンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要な、或いは有害な遺伝子の発現が生じないため、当該タンパク質又はポリペプチドの生産において、その生産性の向上が達成される。

【0020】

尚、削除又は不活性化する遺伝子は1以上であればよく、複数、特に3以上が好ましく、更には5以上であることが好ましい。更に本発明の微生物の構築には、上記以外の遺伝子群の削除又は不活性化を組み合わせることも可能であり、生産性向上に対してより大きな効果が期待される。また、本発明は目的遺伝子中に他のDNA断片を挿入する、あるいは、当該遺伝子の転写・翻訳開始領域に変異を与える等の方法によって目的遺伝子を不活性化することによっても達成できるが、好適には、標的遺伝子を物理的に削除する方がより望ましい。

【0021】

遺伝子群の削除又は不活性化手順としては、表1に示した標的遺伝子を計画的に削除又は不活性化する方法のほか、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化変異を与えた後、適当な方法によりタンパク質生産性の評価及び遺伝子解析を行う方法が挙げられる。

【0022】

標的とする遺伝子を削除又は不活性化するには、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、標的遺伝子の一部を含むDNA断片を適当なプラスミドベクターにクローニングして得られる環状の組換えプラスミドを親微生物細胞内に取り込ませ、標的遺伝子の一部領域に於ける相同組換えによって親微生物ゲノム上の標的遺伝子を分断して不活性化することが可能である。或いは、塩基置換や塩基挿入等によって不活性化した標的遺伝子、又は標的遺伝子の外側領域を含むが標的遺伝子を含まない直鎖状のDNA断片等をPCR等の方法によって構築し、これを親微生物細胞内に取り込ませて親微生物ゲノムの標的遺伝子内の変異箇所の外側の2ヶ所、又は標的遺伝子外側の2ヶ所の領域で2回交差の相同組換えを起こさせることにより、ゲノム上の標的遺伝子を削除或いは不活性化した遺伝子断片と置換することが可能である。

【0023】

特に、本発明微生物を構築するための親微生物として枯草菌を用いる場合、相同組換えにより標的遺伝子を削除又は不活性化する方法については、既にいくつかの報告例があり (Mol. Gen. Genet., 223, 268 (1990)等)、こうした方法を繰り返すことによって、本発明の宿主微生物を得ることができる。

【0024】

また、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化についてもランダムにクローニングしたDNA断片を用いて上述の方法と同様な相同組換えを起こさせる方法や、親微生物にγ線等を照射すること等によっても実施可能である。

【0025】

以下、より具体的にS O E (splicing by overlap extension) - P C R法 (Gene, 77, 61, (1989)) によって調製される削除用D N A断片を用いた二重交差法による削除方法について説明するが、本発明に於ける遺伝子削除方法は下記に限定されるものではない。

【0026】

本方法で用いる削除用D N A断片は、削除対象遺伝子の上流に隣接する約0.5～3 k b断片と、同じく下流に隣接する約0.5～3 k b断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片を挿入した断片である。まず、1回目のP C Rによって、削除対象遺伝子の上流断片及び下流断片、並びに薬剤耐性マーカー遺伝子断片の3断片を調製するが、この際、例えば、上流断片の下流末端に薬剤耐性マーカー遺伝子の上流側10～30塩基対配列、逆に下流断片の上流末端には薬剤耐性マーカー遺伝子の下流側10～30塩基対配列が付加される様にデザインしたプライマーを用いる(図1)。

【0027】

次いで、1回目に調製した3種類のP C R断片を鋳型とし、上流断片の上流側プライマーと下流断片の下流側プライマーを用いて2回目のP C Rを行うことによって、上流断片の下流末端及び下流断片の上流末端に付加した薬剤耐性マーカー遺伝子配列に於いて、薬剤耐性マーカー遺伝子断片とのアニールが生じ、P C R增幅の結果、上流側断片と下流側断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子が挿入したD N A断片を得ることができる(図1)。

【0028】

薬剤耐性マーカー遺伝子として、クロラムフェニコール耐性遺伝子を用いる場合、例えば表2に示したプライマーセットを用い、Pyrobest D N Aポリメーラーゼ(宝酒造)などの一般のP C R用酵素キット等を用いて、成書(PCR Protocols. Current Methods and Applications, Edited by B. A. White, Humana Press, pp251 (1993)、Gene, 77, 61, (1989)等)に示される通常の条件によりS O E - P C Rを行うことによって、各遺伝子の削除用D N A断片が得られる。

【0029】

かくして得られた削除用D N A断片を、コンピテント法等によって細胞内に導入すると、同一性のある削除対象遺伝子の上流及び下流の相同領域において、細胞内での遺伝子組換えが生じ、目標遺伝子が薬剤耐性遺伝子と置換した細胞を薬剤耐性マーカーによる選択によって分離することができる(図1)。即ち、表2に示したプライマーセットを用いて調製した削除用D N A断片を導入した場合、クロラムフェニコールを含む寒天培地上に生育するコロニーを分離し、目的の遺伝子が削除されてクロラムフェニコール耐性遺伝子と置換していることを、ゲノムを鋳型としたP C R法などによって確認すれば良い。

【0030】

次に、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子から選ばれた1以上の遺伝子が削除又は不活性化された宿主微生物変異株に、目的とするタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入することによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。

【0031】

目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は特に限定されず、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や、生理活性ペプチドなどが含まれる。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素(Oxidoreductase)、転移酵素(Transferase)、加水分解酵素(Hydrolase)、脱離酵素(Lyase)、異性化酵素(Isomerase)、合成酵素(Ligase/Synthetase)等が含まれるが、好適にはセルラーーゼ、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素の遺伝子が挙げられる。具体的には、多糖加水分解酵素の分類(Biochem. J., 280, 309 (1991))中でファミリー5に属するセルラーーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセルラーーゼが挙げられる。より具体的な例として、配列番号2又は4で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリセルラーーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列か

らなるセルラーゼが挙げられる。

【0032】

また、 α -アミラーゼの具体例としては、微生物由来の α -アミラーゼが挙げられ、特にバチルス属細菌由来の液化型アミラーゼが好ましい。より具体的な例として、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリアミラーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアミラーゼが挙げられる。尚、アミノ酸配列の同一性はLipman-Pearson法(Science, 227, 1435, (1985))によって計算される。また、プロテアーゼの具体例としては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等が挙げられる。

【0033】

また、目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、その上流に当該遺伝子の転写、翻訳、分泌に関する制御領域、即ち、プロモーターおよび転写開始点を含む転写開始制御領域、リボソーム結合部位および開始コドンを含む翻訳開始領域、又、分泌用シグナルペプチド領域が適正な形で結合されていることが望ましい。例えば、特開2000-210081号公報や特開平4-190793号公報等に記載されているバチルス属細菌、すなわちKSM-S237株(FERM BP-7875)、KSM-64株(FERM BP-2886)由来のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子の転写開始制御領域、翻訳開始領域、分泌用シグナルペプチド領域、より具体的には配列番号1で示される塩基配列の塩基番号1～659の塩基配列、配列番号3で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号1～696の塩基配列、また当該塩基配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA断片、あるいは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなるDNA断片が、目的タンパク質又はポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。

【0034】

上記の目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子を含むDNA断片と適当なプラスミドベクターを結合させた組換えプラスミドを、一般的な形質転換法によって宿主微生物細胞に取り込ませることによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。また、当該DNA断片に宿主微生物ゲノムとの適当な相同領域を結合したDNA断片を用い、宿主微生物ゲノムに直接組み込むことによっても本発明の組換え微生物を得ることができる。

【0035】

本発明の組換え微生物を用いた目的タンパク質又はポリペプチドの生産は、当該菌株を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。

【0036】

以上より、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子から選ばれた1以上の遺伝子が削除又は不活性化された宿主微生物変異株、及び当該変異株を用いて組換え微生物を構築することができ、これを用いれば有用なタンパク質又はポリペプチドを効率的に生産することができる。

【0037】

以下に、枯草菌のccpA遺伝子(BG10376)を削除した組換え枯草菌株構築の実施例を中心、当該発明の組換え微生物の構築方法と、当該組換え微生物を用いたセルラーゼ及び α -アミラーゼの生産方法について具体的に説明する。

【実施例】

【0038】

実施例1

枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鑄型とし、表2に示したccpA-AFとccpA-A/CmR、及びccpA-B/CmFとccpA-BRの各プライマーセットを用いて、ゲノム上のccpA遺伝子の

上流に隣接する0.6 kb断片(A)、及び下流に隣接する0.6 kb断片(B)をそれぞれ調製した。一方、プラスミドpC194 (J. Bacteriol. 150 (2), 815 (1982)) のクロラムフェニコール耐性遺伝子をプラスミドpUC18のXbaI-BamHI切断点に挿入した組換えプラスミドpCBB31を鋳型とし、表2に示したCmFとCmRプライマーセットを用いて、クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む1 kb断片(C)を調製した。次に、得られた(A)(B)(C)3断片を混合して鋳型とし、表2のプライマーccpA-AFとccpA-BRを用いたSOE-PCRを行うことによって、3断片を(A)(C)(B)の順になる様に結合させ、2.2 kbのDNA断片を得た(図1参照)。このDNA断片を用いてコンピテント法により枯草菌168株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体のゲノムを抽出し、PCRによってccpA遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換していることを確認した。

【0039】

【表2-1】

プライマー	塩基配列	配列番号
comA-AF	AAGGATGATAATCCGTCCCGTG	7
comA-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTGGATGGTCATCAATCACTAG	8
comA-B/CmF	CGTCGTGACTGGAAAACGCGAAATCAGACGGTGTAC	9
comA-BR	CGTCGCCATCGGGGGCAC	10
yopO-AF	ATGTATATAGGAGGTTGGTGGTATG	11
yopO-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTGCGCTTGACATGTCAACCTCC	12
yopO-B/CmF	CGTCGTGACTGGAAAACAGATGAGAAAGGAGGAGAAG	13
yopO-BR	ATAACTGTTACTATATAATGGCC	14
treR-AF	GCTGGGATGACGAATCCGA	15
treR-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCTCACCTTCATTATGGACCAC	16
treR-B/CmF	CGTCGTGACTGGAAAACCCACCGTCTCGACAAATTCCG	17
treR-BR	GTTCCAAGCGCGATATAGG	18
yvbA-AF	TATACAGGGATTATCAGTATTGAGC	19
yvbA-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCTTCTCCTTGTGGATCTG	20
yvbA-B/CmF	CGTCGTGACTGGAAAACGGGATAACGATTTATGAAG	21
yvbA-BR	TTTGTAAATAATGATATGAAGCTAGTGTG	22
cspB-AF	ATATCCAGCCCTGCCTCTTC	23
cspB-A/CmR	CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTACAATTGAAATTCCCTCAAAGCGATCATAACG	24
cspB-B/CmF	GTCGTTTACAACGTCGTTGACTGGAAAACCCACAAGCTGCTAACGTTAC	25
cspB-BR	TCCTGTTGGCTCCTGTTG	26
yvAN-AF	TGTTTATGTATGGCGGCCGCGGGAC	27
yvAN-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTGAGCTTCCATATATCTCACC	28
yvAN-B/CmF	CGTCGTGACTGGAAAACACGGTCTGCTGATGACTGAC	29
yvAN-BR	GCGTTACTTAAGATGTCGA	30
yttP-AF	TTTCTAGCGTTCCGCAAATTGAGTTAAG	31
yttP-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCTTACTTCATACGGCTCAC	32
yttP-B/CmF	CGTCGTGACTGGAAAACGAGACGTGGCGCTACCAAC	33
yttP-BR	CGGATTAAAAAGAATATCGCGGACAGC	34
yurK-AF	TGCCGCTGCCGCCGGAGAG	35

【0040】
【表2-2】

yurK-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCAAGGTGTAGAACTTCCGTTG	36
yurK-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACCATCACAGCCCACAC	37
yurK-BR	TCAAATAAAGGCAGCATTCAAGTCC	38
yozA-AF	ATAATGGTATCCAATCCACGC	39
yozA-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCAAGTCAATGTATCACC	40
yozA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGATCCATCACACAGCATG	41
yozA-BR	CACTTCTCAACGGAGGGGATTCACATC	42
licR-AF	TAATGGAGGAGAGAAGGCCG	43
licR-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCAAGTCGCCCCATGAAGCATGAG	44
licR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACCAAAATGCTGAGCTGACAGC	45
licR-BR	TTGCCAATGATGAGGAAAAAGGAACC	46
sigL-AF	CTGAACGTCTGAATAAAAAGCAGG	47
sigL-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTGCTGAAGTTCATATCCATC	48
sigL-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACATTCCGTATCGGCAGCGAG	49
sigL-BR	AGCGGTTTACAAGTTGGAGG	50
mntR-AF	ATTCAGAAGGCATACTTCAAG	51
mntR-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCCATACTTGGTGTGTCATCG	52
mntR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCATAATCACTAAAAAGCGGTC	53
mntR-BR	TTCTGACCGCTCTGGCAACC	54
glcT-AF	ATAATGCCGCTTCCCAACC	55
glcT-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCCGATCCTCAGCTCCTTGTC	56
glcT-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACATCTGATACCGATTAAACC	57
glcT-BR	CAACTGAATCCGAAGGAATG	58
yvdE-AF	TCGGGGTCATGCCGAGCGGT	59
yvdE-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCCAATGTTGCCATTTCATCC	60
yvdE-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACTTGTACGAGAATCAACGCTG	61
yvdE-BR	CACGGCAATGCATTCTCGG	62
ykvE-AF	AGATCTGTCGGCCAGGTTAC	63
ykvE-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCTGATTTCTGTCATGTCTC	64
ykvE-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGGTAGAGATGTGCACCGAAA	65
ykvE-BR	GAGTCAGACGGCATCGATGA	66
slr-AF	TTCTGATTCAATTCACTGCTGG	67
slr-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCAACGGATAATTCTTCAATC	68
slr-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACGTCCATGAAGTCAAATCC	69
slr-BR	CGCTGAAATATTCTCTCGCA	70
rocR-AF	CGCCGCTTCACCGCGGGATTC	71
rocR-A/CmR	GTTATCCGCTACAATTCTTGACCACTGTATGAACC	72

【0041】

【表 2-3】

rocR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACACTCGTCTAACGAATAATCC	73
rocR-BR	TGTCATCACGGAATTGACG	74
ccpA-AF	CCAAATTATCCTTGTGAGCGCGGAATCAG	75
ccpA-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCCGTAGATCGTAATATTGCTC	76
ccpA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACAGCTTAGAAAGTCACCAAG	77
ccpA-BR	TTTGAGCATCAGCACAAGCC	78
yaaT-AF	TGTAGCAGAAGCAGTCGAATT	79
yaaT-A/Cm2R	CTAATGGGTCTTAGTTGACAATTACGCAGCTGTATGT	80
yaaT-B/Cm2F	CTGCCCGTTAGTTGAAGAACTGATAAACCGTAAAAAGTG	81
yaaT-RV	CCTTGAAAAAGGCTCCGT	82
yyaA-AF	GTTTTCCAAGTCTGCCGATAAAAATATGC	83
yyaA-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTGCTCATGTACCTACACC	84
yyaA-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCAATTAACGATTGCATACC	85
yyaA-BR	AAAAAGAAGAAGTCACAGTACAGAACGTGG	86
yycH-AF	ATTTTCGCCATCTTGAATTTC	87
yycH-A/Cm2R	CTAATGGGTCTTAGTTGATGATCCTCTCGTTGAAGTG	88
yycH-B/Cm2F	CTGCCCGTTAGTTGAAGGGATGAGCCTTCAGAAAAGTT	89
yycH-BR	GCCGGACAGAGATCTGTATG	90
yacP-B/Cm4F	GAAGAAGGTTTTATGTTGACGCTTTTGCCCAATACTGTATAA	91
yacP-B/Cm4R	CAAAAAAGCGTCAACATAAAAACCTTCTCAACTAACGGGGCAGG	92
yacP-BR	AAGACGAGTACTTTCTCTAAATCACTT	93
yacP-AF	AACTCGATCAAATGGTGACAGGACAGCATC	94
yacP-A/Cm4F	GGAGAATAAAGACCCCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	95
yacP-A/Cm4R	TGCTTTAGTTGAAGAGGGTCTTATTCTCCCACAGGGTTCTGTT	96
hprK-B/Cm4F	TTTTTATATTACAGCGAGTTGGCGTTAAATGAATGAAGCGATAGA	97
hprK-B/Cm4R	ATTTAACGCCAACTCGCTGTAATATAAAAACCTTCTCAACTAAC	98
hprK-BR	TTGATTGATGATAAATTCAAGGCAGGTGCAG	99
hprK-AF	CAAAGCTTGAGAAATGTTCCCATGCTCTTG	100
hprK-A/Cm4F	CAGGAGGAACATATCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	101
hprK-A/Cm4R	TGCTTTAGTTGAAGAGATATGTTCCCTGTTCCGGGCTGCCCG	102
rsiX-AF	ATTCCAGTTACTCGTAATATAGTTG	103
rsiX-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCACTCATCCATTAGCTC	104
rsiX-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACCTGCTCCAAATCCGATTCC	105
rsiX-BR	GTCCTGCATTTCGAAGTCTGG	106
yhdK-AF	TACACATCCTCAAACAAAGTCTGAACAAAC	107

【0042】

【表2-4】

yhdK-A/Cm4R	TGCTTAGTTGAAGATTACCAAGTTCCATAATTCCACCTCGCCGAC	108
yhdK-B/Cm4F	TTTTTATATTACAGCGTGTGTATACCATTGTATCTGTAGATACGA	109
yhdK-BR	GCTATGATCATTGTAACGAAAGGAAAGGGG	110
yhdK-A/Cm4F	TTATGGAACCTGTAATCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	111
yhdK-B/Cm4R	CAATGGTATAACACACGCTGTAATATAAAAACCTCTTCAACTAAC	112
y1b0-AF	AATCTGAACAAGAAAAAGGAGCTGCTCCCT	113
y1b0-A/Cm4R	TGCTTAGTTGAAGAATTCAATCTCCCTCCATGTCAGCTTATTAA	114
y1b0-B/Cm4F	TTTTTATATTACAGCAGAACGCCTGAAATGAACCGGCCCTATAG	115
y1b0-BR	TGTTTGACAAAGGTAGAACGTCTGCTTATC	116
y1b0-A/Cm4F	GGAGGGAGATTGAATTCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	117
y1b0-B/Cm4R	ATTTCAGGCCGTTCTGCTGTAATATAAAAACCTCTTCAACTAAC	118
CmF	GAATTGTGAGCGGATAAC	119
CmR	GTTTCCCAGTCACGACG	120
Cm2F	CAACTAAAGCACCCATTAG	121
Cm2R	CTTCAACTAACGGGGCAG	122

【0043】

実施例2

一方、実施例1と同様に、表2に示した各遺伝子-AF、各遺伝子-A/CmR、各遺伝子-B/CmF、各遺伝子-BR、CmF、CmRのプライマーセットにより調製した削除用DNA断片を用いて、ゲノム上のcomA、yopQ、treR、yvbA、yvaN、yttP、yurK、yozA、licR、sigL、mntR、glcT、ykvE、s1r、rocR、yyaA、及びrsiX、遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した胞子形成遺伝子削除株をそれぞれ分離した。

【0044】

実施例3

また、表2に示した各遺伝子-AF、各遺伝子-A/Cm2R、各遺伝子-B/Cm2F、各遺伝子-BR、Cm2F、Cm2Rのプライマーセットにより、実施例2と同様に調製した削除用DNA断片を用いて、ゲノム上のcspB、yvdE、yaaT、yych、及びy1b0、各遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した胞子形成遺伝子削除株をそれぞれ分離した。

【0045】

実施例4

更に、表2に示した各遺伝子-AF、各遺伝子-A/Cm4R、各遺伝子-B/Cm4F、各遺伝子-BR、各遺伝子-A/Cm4F、各遺伝子-B/Cm4Rのプライマーセットにより、実施例2と同様に調製した削除用DNA断片を用いて、ゲノム上のyacP、hprK、及びyhdK、各遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した胞子形成遺伝子削除株をそれぞれ分離した。

【0046】

実施例5

実施例1、2にて得られた各遺伝子削除株、及び対照として枯草菌168株に、バチルス エスピ (Bacillus sp.) KSM-S237株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子(特開2000-210081号公報)をコードするDNA断片(3.1kb)がシャトルベクターpHY300PLKのBamHI制限酵素切断点に挿入された組換えプラスミドpHY-S237を、プロトプラスト形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を5mLのLB培地で一夜30℃で振盪培養を行い、更にこの培養液0.03mLを30mLの2×L-マルトース培地(2%トリプトン、1%酵母エキス、1%NaCl、7.5%マルトース、7.5ppm硫酸マンガン4-5水和物、15ppmテトラサイクリン)に接種し、30℃で3日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を

除いた培養液上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表3に示した様に、宿主として各遺伝子削除株を用いた場合、対照の168株（野生型）の場合と比較して高いアルカリセルラーゼの分泌生産が認められた。

【表3】

削除遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子サイズ (bp)	削除サイズ (bp)	アルカリセルラーゼ 分泌生産量 (相対値)
<i>comA</i>	BG10381	645	588	160
<i>yopO</i>	BG13648	213	169	154
<i>treR</i>	BG11011	717	656	139
<i>yvba</i>	BG14078	273	210	137
<i>cspB</i>	BG10824	204	171	132
<i>yvaN</i>	BG14069	408	379	124
<i>yttP</i>	BG13927	624	590	121
<i>yurK</i>	BG13997	729	677	118
<i>yozaA</i>	BG13748	324	289	117
<i>licR</i>	BG11346	1926	1889	116
<i>sigL</i>	BG10748	1311	1256	114
<i>mntR</i>	BG11702	429	399	114
<i>glcT</i>	BG12593	858	811	110
<i>yvdE</i>	BG12414	951	916	109
<i>ykvE</i>	BG13310	438	356	108
<i>slr</i>	BG11858	459	394	105
<i>rockR</i>	BG10723	1386	1359	128
<i>ccpA</i>	BG10376	1005	957	205
<i>yaat</i>	BG10096	828	828	127
<i>yyaA</i>	BG10057	852	816	113
<i>yych</i>	BG11462	1368	1368	146
<i>yacP</i>	BG10158	513	513	156
<i>hprK</i>	BG14125	933	933	196
<i>rsiX</i>	BG10537	1107	1068	125
<i>yhdK</i>	BG13017	291	228	114
<i>y1b0</i>	BG13367	582	582	136
なし (野生型)	—	—	—	100

[0047]

寒施例 6

実施例 6
 実施例 1-4 にて得られた各遺伝子削除株、及び対照として枯草菌 168 株に、バチルス エスピー (Bacillus sp.) KSM-K38 株由来のアルカリアミラーゼ遺伝子（特開 2000-184882 号公報、Eur. J. Biochem., 268, 2974 (2001)）の成熟酵素領域 2000-184882 号公報、Eur. J. Biochem., 268, 2974 (2001) の成熟酵素領域 (Asp1-Gln480) をコードする DNA 断片 (1.5 kb) の上流に配列番号 3 (Asp1-Gln480) を示されるアルカリセルラーゼ遺伝子のプロモーター領域とシグナル配列領域の一部を含む上流側 0.6 kb 断片を結合して成る 2.1 kb 断片（配列番号 5）をシャトルベクタ -pHY300PLK の BglII-XbaI 制限酵素切断部位に挿入された組換えプラスミド pHSP-K38 を、プロトプラス形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を 5 mL の LB 培地で一夜 30℃ で振盪培養を行い、更にこの培養液 0.6 mL を 30 mL の 2×L-マルトース培地 (2% トリプトン、1% 酵母エキス、1% NaCl を 30 mL の 2×L-マルトース、7.5 ppm 硫酸マンガン 4-5 水和物、15 ppm テトラサ 1、7.5% マルトース、7.5 ppm 硫酸マンガン 4-5 水和物、15 ppm テトラサ

イクリン）に接種し、30℃で3～6日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリアミラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリアミラーゼの量を求めた。この結果、表4に示した様に、各遺伝子削除株を宿主として用いた場合、対照の168株（野生型）の場合と比較して高いアルカリアミラーゼの分泌生産が認められた。

【0048】

【表4】

削除遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子サイズ (bp)	削除サイズ (bp)	アルカリアミラーゼ 分泌生産量（相対値）
培養3日間				
<i>Slr</i>	BG11858	459	394	178
<i>treR</i>	BG11011	717	656	124
<i>yopO</i>	BG13648	213	169	364
<i>yvaN</i>	BG14069	408	379	148
<i>yvba</i>	BG14078	273	210	171
なし（野生型）	—	—	—	100
培養5日間				
<i>cspB</i>	BG10824	204	171	195
<i>rocR</i>	BG10723	1386	1359	215
<i>sigL</i>	BG10748	1311	1256	204
<i>glcT</i>	BG12593	858	811	132
<i>yvdE</i>	BG12414	951	916	127
<i>yacP</i>	BG10158	513	513	110
なし（野生型）	—	—	—	100
培養6日間				
<i>yyCH</i>	BG11462	1368	1368	120
<i>licR</i>	BG11346	1926	1889	122
なし（野生型）	—	—	—	100

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、S O E - P C Rによる遺伝子削除用D N A断片の調製、及び当該D N A断片を用いて標的遺伝子を削除（薬剤耐性遺伝子と置換）する方法を模式的に示したものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Host microorganisms

<130> P05021511

<160> 122

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3150

<212> DNA

<213> Bacillus sp. KSM-S237

<220>

<221> CDS

<222> (573)..(3044)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (573)..(659)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (660)..()

<223>

<400> 1

gatttgcga tgcaacaggc ttatatttag agaaatttc ttttaaattt gaatacgaa	60
taaaatcagg taaacagggtc ctgatttat tttttgagt ttttagaga actgaagatt	120
gaaataaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagtttaat tatagaaaac	180
gccttttat aattattttt acctagaacg aaaatactgt ttccaaagcg gtttactata	240
aacacctata ttccggctct ttttaaaac aggggtaaa aattcactct agtattctaa	300
tttcaacatg ctataataaa ttgttaagac gcaatatgca tcttttt tacgatataat	360
gtaagcggtt aaccttgtgc tatatgccga tttaggaagg gggtagatt gagtcaagta	420
gtaataatat agataactta taagttgtg agaagcagga gagcatctgg gttactcaca	480

agtttttta aaacttaac gaaagcactt tcggtaatgc ttatgaattt agctatttga	540
ttcaattact taaaaatat ttaggaggta at atg atg tta aga aag aaa aca Met Met Leu Arg Lys Lys Thr	593
	-25
aag cag ttg att tct tcc att ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu	641
	-20
	-15
	-10
ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe	689
	-5
	-1
	1
	5
	10
aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly	737
	15
	20
	25
gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga caa atg aca tta gta gat caa Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln	785
	30
	35
	40
cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga atg agt aca cac gga tta cag His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln	833
	45
	50
	55
tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac gca tac aaa gct ctt tct aac Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn	881
	60
	65
	70
gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt gct atg tat gta ggt gaa aat Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn	929
	75
	80
	85
	90
ggg tac gct aca aac cct gag tta atc aaa caa aga gtg att gat gga Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly	977
	95
	100
	105
att gag tta gcg att gaa aat gac atg tat gtt att gtt gac tgg cat Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His	1025
	110
	115
	120
gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat cct gtt tat gca ggt gct aaa Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys	1073
	125
	130
	135
gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta tac cct aat aat cca cac att Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile	1121
	140
	145
	150

att tat gag tta gcg aat gag ccg agt agt aat aat ggt gga gca Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala 155 160 165 170	1169
ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg aaa gcg gta aaa gaa tat gct Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala 175 180 185	1217
gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa agc ggt aat gca gat gac aac Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn 190 195 200	1265
att atc att gtt ggt agt cca aac tgg agt cag cgt ccg gac tta gca Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala 205 210 215	1313
gct gat aat cca att gat gat cac cat aca atg tat act gtt cac ttc Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe 220 225 230	1361
tac act ggt tca cat gct tca act gaa agc tat ccg tct gaa act Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr 235 240 245 250	1409
cct aac tct gaa aga gga aac gta atg agt aac act cgt tat gcg tta Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu 255 260 265	1457
gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca gag tgg gga acg agt caa gct Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala 270 275 280	1505
agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat gaa gca gat gta tgg att gaa Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu 285 290 295	1553
ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn 300 305 310	1601
aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser 315 320 325 330	1649
aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca gat cat gtg tgg gca cca gaa Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu 335 340 345	1697
gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val	1745

350	355	360	
aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp 365	370	375	1793
ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt gga gtg aat tcg gat tct cca Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro 380	385	390	1841
aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat gaa aac aac act ttg aaa gtt Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val 395	400	405	1889
tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt tca gat ggc aac ttc tgg gct Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala 415	420	425	1937
aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg gga aaa agt gtt gat att tta Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu 430	435	440	1985
ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt att gtt gat gaa cca acg acg Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr 445	450	455	2033
gta gct att gcg gcg att cca caa agt agt aaa agt gga tgg gca aat Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn 460	465	470	2081
cca gag cgt gct cga gtg aac gcg gaa gat ttt gtc cag caa acg Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr 475	480	485	2129
gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca att aca gga gaa gat gct cct Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro 495	500	505	2177
aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa gaa gat aac aat atg aac aac Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn 510	515	520	2225
atc att ctg ttc gtg gga act gat gca gct gac gtt att tac tta gat Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp 525	530	535	2273
aac att aaa gta att gga aca gaa gtt gaa att cca gtt gtt cat gat Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp 540	545	550	2321

cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct gtt ttt gaa gac ggt aca cgt Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg 555 560 565 570	2369
caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct ggt gtg aaa aca gct tta aca Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr 575 580 585	2417
att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg tta tca tgg gaa ttt gga tat Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr 590 595 600	2465
cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg gca aca gct cca cgt tta gat Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp 605 610 615	2513
ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt gag aat gat tat gta gct ttt Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe 620 625 630	2561
gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile 635 640 645 650	2609
aat tta gta ttc cag cca cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro 655 660 665	2657
aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu Ala Asn Gln Val 670 675 680	2705
aat ggt tta tat cac tat gaa gtt aaa att aac gta aga gat att aca Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr 685 690 695	2753
aac att caa gat gac acg tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala 700 705 710	2801
gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg 715 720 725 730	2849
ttt gag ggg gct gct act act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp 735 740 745	2897
cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat gag aag gaa gca aaa aaa gaa Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu	2945

750

755

760

caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa gaa gca gta aaa gaa gaa aag
 Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys
 765 770 775 2993

aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca gtc aaa aat gag gct aag aaa
 Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys
 780 785 790 3041

aaa taatctatta aactagttat agggtttatct aaaggctctga tgttagatctt
 Lys
 795 3094

ttagataacc tttttttgc ataactggac acagagttgt tattaaagaa agtaag 3150

<210> 2
<211> 824
<212> PRT
<213> Bacillus sp. KSM-S237

<400> 2

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile
 -25 -20 -15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly
 -10 -5 -1 1

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val
 5 10 15

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly
 20 25 30 35

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly
 40 45 50

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn
 55 60 65

Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu
 70 75 80

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile
 85 90 95

Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met
 100 105 110 115

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp
 120 125 130

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu
 135 140 145

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser
 150 155 160

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp
 165 170 175

Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys
 180 185 190 195

Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp
 200 205 210

Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His
 215 220 225

Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr
 230 235 240

Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met
 245 250 255

Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr
 260 265 270 275

Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp
 280 285 290

Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp
 295 300 305

Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr
 310 315 320

Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro
 325 330 335

Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val
 340 345 350 355

Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys
 360 365 370

Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe
 375 380 385

Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn
 390 395 400

Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val
 405 410 415

Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp
 420 425 430 435

Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val
 440 445 450

Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser
 455 460 465

Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala
 470 475 480

Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr
485 490 495

Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu
500 505 510 515

Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala
520 525 530

Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val
535 540 545

Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser
550 555 560

Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser
565 570 575

Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala
580 585 590 595

Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp
600 605 610

Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly
615 620 625

Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala
630 635 640

Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn
645 650 655

Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu
660 665 670 675

Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys
 680 685 690

Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg
 695 700 705

Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg
 710 715 720

Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro
 725 730 735

Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp
 740 745 750 755

Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys
 760 765 770

Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala
 775 780 785

Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys
 790 795

<210> 3
<211> 3332
<212> DNA
<213> Bacillus sp. KSM-64

<220>
<221> CDS
<222> (610)..(3075)
<223>

<220>
<221> sig_peptide
<222> (610)..(696)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (697)..()

<223>

<400> 3
 agtacttacc attttagagt caaaaagatag aagccaaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60
 cttatattta gagggaaattt ctttttaaat tgaatacgga ataaaatcag gtaaacaggt 120
 cctgatttta ttttttgaa tttttttag aactaaagat tgaaatagaa gtagaaagaca 180
 acggacataa gaaaattgtt atagtttaa ttatagaaaa cgctttcta taattattta 240
 tacctagaac gaaaatactg ttgcgaaagc ggttactat aaaaccttat attccggctc 300
 ttttttaaa caggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360
 atttgcaga cgcaatatac atcttttt tatgatattt gtaagcggtt aaccttgtgc 420
 tatagccga tttaggaagg gggtagattt agtcaagtag tcataattta gataacttat 480
 aagttgtga gaagcaggag agaatctggg ttactcacaa gtttttaaa acattatcga 540
 aagcacttgc gttatgctt atgaatttag ctatttgatt caattactt aataatttt 600
 ggaggtaat atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att 651
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile
 -25 -20
 ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg aca gct ctt gca gca 699
 Leu Ile Leu Val Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala
 -15 -10 -5 -1 1
 gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac 747
 Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp
 5 10 15
 aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc 795
 Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val
 20 25 30
 gat gga caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta 843
 Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu
 35 40 45
 cgt gga atg agt aca cac gga tta caa tgg ttt cct gag atc ttg aat 891
 Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn
 50 55 60 65
 gat aac gca tac aaa gct ctt gct aac gat tgg gaa tca aat atg att 939
 Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile
 70 75 80

cgt cta gct atg tat gtc ggt gaa aat ggc tat gct tca aat cca gag Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu 85 90 95	987
tta att aaa agc aga gtc att aaa gga ata gat ctt gct att gaa aat Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn 100 105 110	1035
gac atg tat gtc atc gtt gat tgg cat gta cat gca cct ggt gat cct Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro 115 120 125	1083
aga gat ccc gtt tac gct gga gca gaa gat ttc ttt aga gat att gca Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala 130 135 140 145	1131
gca tta tat cct aac aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu 150 155 160	1179
cca agt agt aac aat aat ggt gga gct ggg att cca aat aat gaa gaa Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu 165 170 175	1227
ggt tgg aat gcg gta aaa gaa tac gct gat cca att gta gaa atg tta Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu 180 185 190	1275
cgt gat agc ggg aac gca gat gac aat att atc att gtg ggt agt cca Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro 195 200 205	1323
aac tgg agt cag cgt cct gac tta gca gct gat aat cca att gat gat Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp 210 215 220 225	1371
cac cat aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala 230 235 240	1419
tca act gaa agc tat ccg cct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn 245 250 255	1467
gta atg agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gca gta ttt Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe 260 265 270	1515
gca aca gag tgg gga act agc caa gca aat gga gat ggt ggt cct tac	1563

Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr
 275 280 285

ttt gat gaa gca gat gta tgg att gag ttt tta aat gaa aac aac att 1611
 Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile
 290 295 300 305

agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca 1659
 Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala
 310 315 320

ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca aca agt ctt gac cca 1707
 Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro
 325 330 335

ggg cca gac caa gta tgg gta cca gaa gag tta aat ctt tct gga gaa 1755
 Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu
 340 345 350

tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt 1803
 Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg
 355 360 365

aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa 1851
 Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln
 370 375 380 385

gga ttt gga gtg aat gga gat tct cca gtt gaa gat gta gtt att gag 1899
 Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu
 390 395 400

aat gaa gcg ggc gct tta aaa ctt tca gga tta gat gca agt aat gat 1947
 Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp
 405 410 415

gtt tct gaa ggt aat tac tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc gac ggt 1995
 Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly
 420 425 430

tgg gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gaa aaa ctt act atg gat 2043
 Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp
 435 440 445

gtg att gtt gat gag ccg acc acg gta tca att gct gca att cca caa 2091
 Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln
 450 455 460 465

ggg cca tca gcc aat tgg gtt aat cca aat cgt gca att aag gtt gag 2139
 Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu
 470 475 480

cca act aat ttc gta ccg tta gga gat aag ttt aaa gcg gaa tta act Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr 485 490 495	2187
ata act tca gct gac tct cca tcg tta gaa gct att gcg atg cat gct Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala 500 505 510	2235
gaa aat aac aac atc aac aac att ctt ttt gta gga act gaa ggt Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly 515 520 525	2283
gct gat gtt atc tat tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val 530 535 540 545	2331
gaa att cca gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser 550 555 560	2379
gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser 565 570 575	2427
ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala 580 585 590	2475
tta tca tgg gaa ttt gga tac cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp 595 600 605	2523
gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly 610 615 620 625	2571
gaa aat gat tat gta act ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala 630 635 640	2619
aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn 645 650 655	2667
ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu 660 665 670	2715
tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa	2763

Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys
 675 680 685

att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt 2811
 Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg
 690 695 700 705

aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga 2859
 Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg
 710 715 720

gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg 2907
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro
 725 730 735

gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg ccg cct gtc gat 2955
 Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp
 740 745 750

gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa 3003
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys
 755 760 765

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 3051
 Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala
 770 775 780 785

atc aaa aat gag gct acg aaa aaa taatctaata aactagttat agggtttatct 3105
 Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys
 790

aaaggtctga tgcagatctt ttagataacc ttttttgca taactggaca tagaatggtt 3165

attaaagaaa gcaagggttt tatacgatat taaaaaggta gcgattttaa attgaaacct 3225

ttaataatgt ctgtgtatag aatgatgaag taatttaaga gggggaaacg aagtgaaaac 3285

ggaaatttct agttagaagaa aaacagacca agaaatactg caagctt 3332

<210> 4

<211> 822

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-64

<400> 4

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile
 -25 -20 -15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala Glu Gly
-10 -5 -1 1

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val
5 10 15

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly
20 25 30 35

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly
40 45 50

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn
55 60 65

Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile Arg Leu
70 75 80

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu Leu Ile
85 90 95

Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met
100 105 110 115

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp
120 125 130

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala Ala Leu
135 140 145

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser
150 155 160

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp
165 170 175

Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Asp

180

185

190

195

Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp
 200 205 210

Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His
 215 220 225

Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr
 230 235 240

Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met
 245 250 255

Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr
 260 265 270 275

Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Pro Tyr Phe Asp
 280 285 290

Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp
 295 300 305

Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr
 310 315 320

Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro Gly Pro
 325 330 335

Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val
 340 345 350 355

Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys
 360 365 370

Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe
 375 380 385

Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu Asn Glu
 390 395 400

Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp Val Ser
 405 410 415

Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly Trp Gly
 420 425 430 435

Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile
 440 445 450

Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln Gly Pro
 455 460 465

Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu Pro Thr
 470 475 480

Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr Ile Thr
 485 490 495

Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala Glu Asn
 500 505 510 515

Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly Ala Asp
 520 525 530

Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile
 535 540 545

Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe
 550 555 560

Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val
 565 570 575

Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser

580

585

590

595

Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr
 600 605 610

Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn
 615 620 625

Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu
 630 635 640

Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr
 645 650 655

Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu
 660 665 670 675

Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn
 680 685 690

Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met
 695 700 705

Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe
 710 715 720

Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu
 725 730 735

Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys
 740 745 750 755

Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala
 760 765 770

Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Ile Lys
 775 780 785

Asn Glu Ala Thr Lys Lys
790

<210> 5
<211> 2343
<212> DNA
<213> Bacillus sp. pHSP-K38

<220>
<221> CDS
<222> (580)..(2067)
<223>

<220>
<221> sig_peptide
<222> (580)..(627)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (628)..()
<223>

<400> 5
agatcttagca ggatttgcgg atgcaaccgg cttatattta gagggaaattt ctttttaaat 60
tgaatacggg ataaaaatcag gtaaacagggt cctgatttttta tttttttgaa tttttttgag 120
aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca acggacataa gaaaattgttta ttatgtttaa 180
ttatagaaaaa cgctttctta taattttttta tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc 240
ggtttactat aaaaccccttat attccggctc tttttttaaa caggggggtga aaatttcactc 300
tagtattctta atttcaacat gctataataa atttgtttaa gccaatatac atctttttt 360
tatgatattt gtaagcggtt aacccttgtgc tatatgccga ttttaggaagg gggtagattg 420
agtcaagtag tcataattta gataacttat aagttgttga gaagcaggag agaatctggg 480
ttactcacaa gttttttaaa acattatcga aagcactttc ggttatgctt atgaatttag 540
ctatggattt caattacttt aataattttt ggaggtat atg atg tta aga aag 594
Met Met Leu Arg Lys
-15

aaa aca aag cag ttg ggt cga cca gca caa gcc gat gga ttg aac ggt 642
Lys Thr Lys Gln Leu Gly Arg Pro Ala Gln Ala Asp Gly Leu Asn Gly

-10	-5	-1 1	5	
acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa aac gac ggg cag cat Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His				690
10 15 20				
tgg aat cggttg cac gat gat gcc gca gct ttg agt gat gct ggt att Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Leu Ser Asp Ala Gly Ile				738
25 30 35				
aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt aat agt cag gcg gat Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp				786
40 45 50				
gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta gga gag ttc aat caa Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln				834
55 60 65				
aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag gca cag ctt gaa cga Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg				882
70 75 80 85				
gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat gta tac gga gat gtc Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val				930
90 95 100				
gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg gag gca gtg caa gct Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala				978
105 110 115				
gtt caa gta aat cca acg aat cgt tgg cag gat att tca ggt gcc tac Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Ala Tyr				1026
120 125 130				
acg att gat gcg tgg acg ggt ttc gac ttt tca ggg cgt aac aac gcc Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser Gly Arg Asn Asn Ala				1074
135 140 145				
tat tca gat ttt aag tgg aga tgg ttc cat ttt aat ggt gtt gac tgg Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp				1122
150 155 160 165				
gat cag cgc tat caa gaa aat cat att ttc cgc ttt gca aat acg aac Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn				1170
170 175 180				
tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aac ggt aat tat gat tac ctg tta Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu				1218
185 190 195				

gga tcg aat atc gac ttt agt cat cca gaa gta caa gat gag ttg aag Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val Gln Asp Glu Leu Lys 200 205 210	1266
gat tgg ggt agc tgg ttt acc gat gag tta gat ttg gat ggt tat cgt Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg 215 220 225	1314
tta gat gct att aaa cat att cca ttc tgg tat aca tct gat tgg gtt Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val 230 235 240 245	1362
cgg cat cag cgc aac gaa gca gat caa gat tta ttt gtc gta ggg gaa Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu 250 255 260	1410
tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt tat tta gat gaa atg Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met 265 270 275	1458
aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt cca ctt aat tat aat ttt tac Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr 280 285 290	1506
cgg gct tca caa caa ggt gga agc tat gat atg cgt aat att tta cga Arg Ala Ser Gln Gln Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg 295 300 305	1554
gga tct tta gta gaa gcg cat ccg atg cat gca gtt acg ttt gtt gat Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp 310 315 320 325	1602
aat cat gat act cag cca ggg gag tca tta gag tca tgg gtt gct gat Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp 330 335 340	1650
tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca att ttg acg cgt gaa ggt ggt Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly 345 350 355	1698
tat cca aat gta ttt tac ggt gat tac tat ggg att cct aac gat aac Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn 360 365 370	1746
att tca gct aaa aaa gat atg att gat gag ctg ctt gat gca cgt caa Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln 375 380 385	1794
aat tac gca tat ggc acg cag cat gac tat ttt gat cat tgg gat gtt Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Val	1842

390	395	400	405	
gta gga tgg act agg gaa gga tct tcc tcc aga cct aat tca ggc ctt Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu				1890
410		415		420
gcg act att atg tcg aat gga cct ggt ggt tcc aag tgg atg tat gta Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val				1938
425		430		435
gga cgt cag aat gca gga caa aca tgg aca gat tta act ggt aat aac Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn Asn				1986
440	445		450	
gga gcg tcc gtt aca att aat ggc gat gga tgg ggc gaa ttc ttt acg Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr				2034
455	460		465	
aat gga gga tct gta tcc gtg tac gtg aac caa taacaaaaag ccttgagaag Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln				2087
470	475		480	
ggattcctcc ctaactcaag gctttctta tgtcgcttag cttagcgtt ctacgacttt gaagcttggg gatccgtcga gacaaggtaa aggataaaac agcacaattc caagaaaaac				2147
acgattttaga acctaaaaag aacgaattt aactaactca taaccgagag gtaaaaaaaag				2207
aacgaagtgc agatcaggaa atgagtttat aaaataaaaa aagcacctga aaagggtgtct				2267
tttttgatg tctaga				2327
				2343

<210> 6
<211> 496
<212> PRT
<213> ·Bacillus sp. pHSP-K38

<400> 6

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Gly Arg Pro Ala Gln Ala
-15 -10 -5 -1

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu
1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu
20 25 30

Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn
 85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr
 100 105 110

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp
 115 120 125

Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser
 130 135 140

Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe
 145 150 155 160

Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg
 165 170 175

Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn
 180 185 190

Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val
 195 200 205

Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp
 210 215 220

Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr
 225 230 235 240

Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu
 245 250 255

Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe
 260 265 270

Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285

Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met
 290 295 300

Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala
 305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu
 325 330 335

Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu
 340 345 350

Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
 355 360 365

Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu
 370 375 380

Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe
 385 390 395 400

Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg
 405 410 415

Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser
 420 425 430

Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
435 440 445

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
450 455 460

Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
465 470 475 480

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

aaggatgata atccgtcccg tg 22

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gttatccgct cacaattcgg atggcatca atcactag 38

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

cgtcgtgact gggaaaactg cgaaatcaga cggtgtac 38

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

cgtcgccatat cggcgggcac 20

<210> 11

特願 2003-379167

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 11
atgtatata gaggttgggtg gtatg 25

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 12
gttatccgct cacaattcgc tctgacatgt caacctcc 38

<210> 13
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 13
cgtcgact gggaaaacag atgagaaagg aggagaag 38

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 14
ataactgtta ctatataatg gcc 23

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 15
gctggggatg acgaatccga 20

<210> 16
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 16

出証特 2004-3113540

gttatccgct cacaattctc accttcattt tggaccac 38

<210> 17
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 17
cgtcgtgact gggaaaacca ccgtctcgaca aattccg 38

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 18
tttgccaaggc gcgatataagg 20

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 19
tatacaggga ttatcagtat tgagc 25

<210> 20
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 20
gttatccgct cacaattctt ttctccttgt tggatctg 38

<210> 21
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 21
cgtcgtgact gggaaaacgg ggataacgat ttatgaag 38

<210> 22
<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ttttgtatata atgatatgaa gctagtgttg 30

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

atatccagcc ctgcctcttc 20

<210> 24

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc gaaatttcct cctaaaggcgta tcataacg 58

<210> 25

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

gtcgaaaaaacgtcgtttactggggaaaaa cccacaaggct gctaacgtta c 51

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

tcctgtttgg gctcctgttg 20

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

tgttatgtatggcggcctg cgggac 26

<210> 28
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 28
gttatccgct cacaattcag ctttccatataatctcacc 38

<210> 29
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 29
cgtcgtgact gggaaaacac ggtctgctga tgactgac 38

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 30
gcgttactt aagatgtcga 20

<210> 31
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 31
ttcttagcgt ttcggcaaat tgagttaag 39

<210> 32
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 32
gttatccgct cacaattcct tactttcata cggtcac 38

<210> 33
<211> 38
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

cgtcgtgact gggaaaacga gacgtggcgc tcaccaac 38

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

cggattaaaa aaagaatatac gcggacagc 29

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

tgccgctgcc cgccggagag 20

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

gttatccgct cacaattcaa ggtgtagaac ttccgttg 38

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

cgtcgtgact gggaaaacac catcaacagc ccctacac 38

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

tcaaataaag gcggcattca gtcc 24

<210> 39
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 39
ataatggat ccaaattcac gc 22

<210> 40
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 40
gttatccgct cacaattcat tcagtcatat gtatcacc 38

<210> 41
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 41
cgtcggtact gggaaaacga tccatcatac acagcatg 38

<210> 42
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 42
cacttctcaa cggaggggat ttcacatc 28

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 43
taatggagga gagaaggccg 20

<210> 44
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 44
gttatccgct cacaattcag tcgccccatga agcatgag 38

<210> 45
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 45
cgtcgtgact gggaaaacac caaaaaatgc tgagctgaca gc 42

<210> 46
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 46
ttgccaatga tgaggaaaaa ggaacc 26

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 47
ctgaacgtcttgaataaaaaaggcagg 26

<210> 48
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 48
gttatccgct cacaattcgc tgaagttca tatccatc 38

<210> 49
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 49
cgtcgtgact gggaaaacat tccgtcatcg gcagcgag 38

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 50
agcggttac aagtggagg 20

<210> 51
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 51
attcagaag gcatacttca ag 22

<210> 52
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 52
gttatccgct cacaattcca tacttggtgt tgtcatcg 38

<210> 53
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 53
cgtcgtgact gggaaaacca taatcagtaa aaaggcggtc 40

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 54
ttctgaccgc tctggcaacc 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 55
ataatgcccg cttcccaacc 20

<210> 56
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 56
gttatccgct cacaattccg atcctcagct cctttgtc 38

<210> 57
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 57
cgtcgtgact gggaaaactc atctgatacc gattaacc 38

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 58
caactgaatc cgaaggaatg 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 59
tcggggcat gccgagcggt 20

<210> 60
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 60
gttatccgct cacaattcca atgttgccat tttcatcc 38

<210> 61

特願 2003-379167

<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 61
cgtcgtgact gggaaaacctt gtacgagaat caacgctg 38

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 62
cacggcaatg cattcttcgg 20

<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 63
agatctgtcg gccaggtta c 20

<210> 64
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 64
gttatccgct cacaattctg attttctgt catgtctc 61

<210> 65
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 65
cgtcgtgact gggaaaacgg tagagatgtg caccgaaa 38

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 66

出証特 2004-3113540

gagtcagacg gcatcgatga 20

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 67
ttctgattca ttttcactgc tgg 23

<210> 68
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 68
gttatccgct cacaattcaa cggtataattc ttccaatc 38

<210> 69
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 69
cgtcgtgact gggaaaactg tccatgaagt caaatcc 37

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 70
cgctgaaata ttctctcgca 20

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 71
cgccgcttcc accgcccattt c 21

<210> 72
<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 72

gttatccgct cacaattcct ttgaccactg tatgaacc 38

<210> 73

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 73

cgtcgtgact gggaaaacac tcgtctaacg aataatcc 38

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 74

tgtcatcacg gaatttgacg 20

<210> 75

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 75

ccaaatttac ctttgtgagc gcggaatcag 30

<210> 76

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 76

gttatccgct cacaattccg tagatcgtaa tattgctc 38

<210> 77

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 77

cgtcgtgact gggaaaacag ctttagaaagt caaccaag 38

<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 78
tttgagcatc agcacaagcc 20

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 79
ttagcagaaa gcagtcgaat t 21

<210> 80
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 80
ctaatgggtg cttagttga caattacgca gctgtcatgt 40

<210> 81
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 81
ctgccccgtt agttgaagaa ctgataaacc gtgaaaaagt g 41

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 82
cccttgaaaa aggctcccgt 20

<210> 83
<211> 29
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 83

gtttccaag tctgccata aaaatatgc 29

<210> 84

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 84

gttatccgct cacaattcat gcttcatgta cctacacc 38

<210> 85

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 85

cgtcgtgact gggaaaacca attaacgatt cgcatacc 38

<210> 86

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 86

aaaaagaaga agtcacagta cagaacgtgg 30

<210> 87

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 87

attttgcgcc atcttgaatt ttc 23

<210> 88

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 88

ctaatgggtg cttagttgg atgatcctct cgtgaactg 40

<210> 89
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 89
ctgccccgtt agttgaaggg atgagccttc agaaaagtt 39

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 90
gccggacaga gatctgtatg 20

<210> 91
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 91
gaagaaggtt tttatgttga cgctttttg cccaaatactg tataa 45

<210> 92
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 92
caaaaaagcg tcaacataaa aaccttcttc aactaacggg gcagg 45

<210> 93
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 93
aagacgagta cttttctctc taaatcactt 30

<210> 94
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 94

aactcgatca aatggtgaca ggacagcatc 30

<210> 95

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 95

ggagaataaa gaccctcttc aactaaagca cccatttagtt caaca 45

<210> 96

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 96

tgcatttagtt gaagagggtc tttattctcc cacagggtt cgttt 45

<210> 97

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 97

tttttatatt acagcgagtt ggcgttaaat gaatgaagcg ataga 45

<210> 98

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 98

atttaacgcc aactcgctgt aatataaaaa cttcttcaa ctaac 45

<210> 99

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 99

ttgattgatg ataaattcag gcaggtgcag 30

<210> 100
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 100
caaagcttga gaaatgttcc catgcttttg 30

<210> 101
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 101
caggaggaac atatctcttc aactaaagca cccatttagtt caaca 45

<210> 102
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 102
tgcttagtt gaagagatat gttcctcctg ttccgggctg ccccg 45

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 103
attccagttt ctcgtaatat agttt 25

<210> 104
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 104
gttatccgct cacaattcac ttcatcatcc attagctc 38

<210> 105
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 105
cgtcgtgact gggaaaacct gctccaaatc cgatttcc 38

<210> 106
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 106
gtcctgcatt tttcgaaagtc tgg 23

<210> 107
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 107
tacacatcct tcaaacaagt ctgaacaaac 30

<210> 108
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 108
tgcttagtt gaagattacc agttccataa ttccacctcg ccgac 45

<210> 109
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 109
tttttatatt acagcgtgtg tataccattt tatctgtaga tacga 45

<210> 110
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 110
gctatgatca ttgtaacgaa aggaaagggg 30

<210> 111

<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 111
ttatggaact ggtaatcttc aactaaagca cccatttagtt caaca 45

<210> 112
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 112
caatggata cacacgctgt aatataaaaa ctttcttcaa ctaac 45

<210> 113
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 113
aatctgaaca agaaaaagga gctgctcctc 30

<210> 114
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 114
tgcttagtt gaagaattca atctccctcc atgtcagctt attta 45

<210> 115
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 115
tttttatatt acagcagaaa cgccctgaaat gaaccggccc tatag 45

<210> 116
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 116

tgttgacaa aggtagaacg tctgcttatac 30

<210> 117

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 117

ggagggagat tgaatttttc aactaaagca cccatttagtt caaca 45

<210> 118

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 118

atttcaggcg tttctgctgt aatataaaaa ctttttcaa ctaac 45

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 119

gaatttgtgag cggtataac 18

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 120

gttttcccag tcacgacg 18

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 121

caactaaagc acccatttag 19

<210> 122

<211> 18

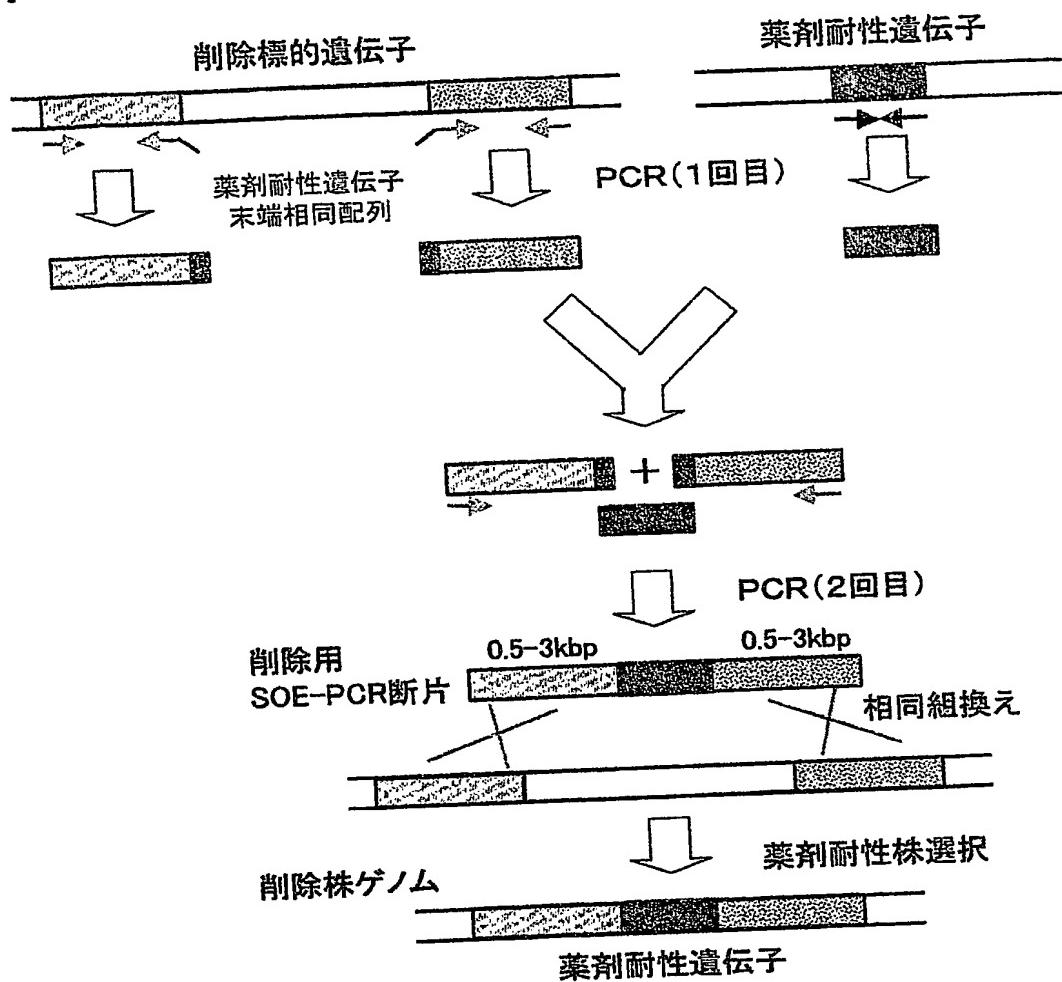
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 122

cttcaactaa cggggcag 18

【書類名】 図面
【図 1】



【書類名】要約書**【要約】**

【課題】 タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物にタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供する。

【解決手段】 枯草菌の遺伝子comA、yop0、treR、yvbA、cspB、yvAN、yttP、yurK、yozA、licR、sigL、mntR、glcT、yvdE、ykvE、sir、rocR、ccpA、yaaT、yyaA、yyCH、yacP、hprK、rsiX、yhdK及びy1b0のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか1以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物変異株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

【選択図】 なし

特願 2003-379167

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2003-379167

受付番号

50301850132

書類名

特許願

担当官

関 浩次

7475

作成日

平成15年11月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年11月 7日

出証特 2004-3113540

特願 2003-379167

出願人履歴情報

識別番号

[000000918]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所
氏 名

1990年 8月24日

新規登録

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

花王株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.